

**DIHYDROSTREPTOMYCIN-BINDUNG AN E.COLI RIBOSOMEN:
IDENTIFIZIERUNG DER BETEILIGTEN PROTEINE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerd Schreiner
aus Hamburg

1973

**DIHYDROSTREPTOMYCIN-BINDUNG AN E.COLI RIBOSOMEN:
IDENTIFIZIERUNG DER BETEILIGTEN PROTEINE**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gerd Schreiner

aus Hamburg



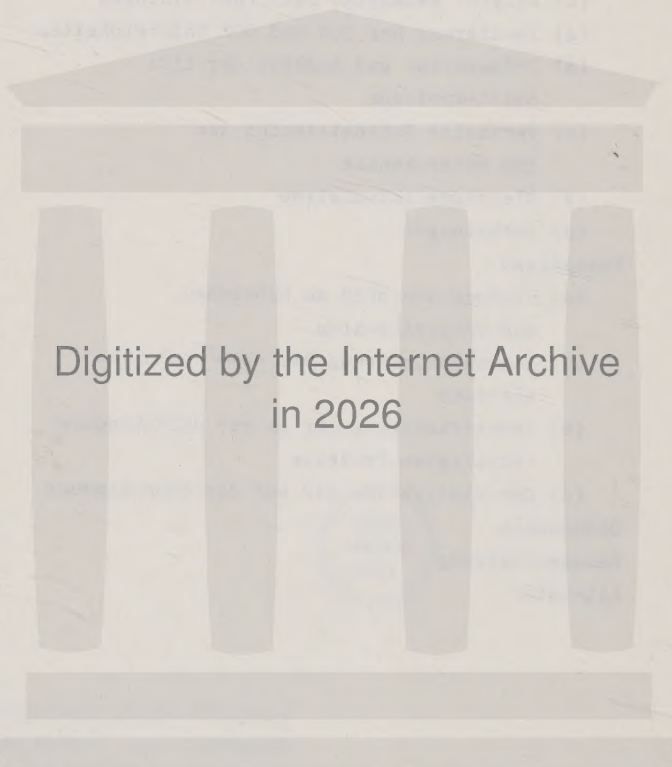
1. Referent: Prof. Wittmann

2. Referent: Prof. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1973

Inhalt

Einleitung	Seite 1
Material und Methoden	Seite 3
(a) Chemikalien und Puffer	Seite 3
(b) Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese	Seite 3
(c) Isolierung der 30S und 50S Untereinheiten	Seite 4
(d) Präparation und Analyse der LiCl Split-Proteine	Seite 4
(e) Partielle Rekonstitution der 30S Untereinheit	Seite 6
(f) Gleichgewichtsdialyse	Seite 6
(g) Abkürzungen	Seite 7
Ergebnisse	Seite 8
(a) Bindung von dHSM an Ribosomen und Untereinheiten	Seite 8
(b) Charakterisierung des dHSM Bindungs- zentrums	Seite 10
(c) Identifizierung der an der dHSM-Bindung beteiligten Proteine	Seite 14
(d) Der Einfluß von S12 auf die dHSM-Bindung	Seite 18
Diskussion	Seite 20
Zusammenfassung	Seite 27
Literatur	Seite 28



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543105_0021

Einleitung

Streptomycin, als bekanntester Vertreter der Aminoglycosid-Antibiotika, hemmt vollständig die Proteinsynthese in sensitiven Bakterien (Spotts & Stanier, 1961). Bei subletalen Konzentrationen bewirkt es eine phänotypische Suppression einiger auxotropher Mutanten (Gorini, Gundersen & Burger, 1961). Das bedeutet, daß zum Beispiel missense oder nonsense Mutanten, die in einem Gen eines Enzyms auftreten und dessen Aktivität verringern, durch das von Streptomycin hervorgerufene Fehllesen der genetischen Information zu einem gewissen Prozentsatz wieder aktiv werden. Dabei können bei missense Mutanten falsche Aminosäuren durch andere, den ursprünglichen ähnliche ausgetauscht werden, oder ein Stopcodon kann als Information für eine Aminosäure erkannt werden, wodurch der Kettenabbruch verhindert wird. Aber auch in in vitro Systemen mit Homopolynukleotiden (z.B. Polyuridylsäure) als messenger kann dieses durch Streptomycin hervorgerufene Fehllesen beobachtet werden (Davies, Gilbert & Gorini, 1964; Davies, Gorini & Davis, 1965).

Es konnte nachgewiesen werden, daß der Wirkort von Streptomycin das Ribosom ist (Spotts & Stanier, 1961; Flaks, Cox, Witting & White, 1962; Speyer, Lengyel & Basilio, 1962; Davies et al., 1964). Durch kreuzweisen Austausch der Untereinheiten von sensitiven und resistenten Ribosomen wurde festgestellt, daß die Streptomycinwirkung mit der kleinen ribosomalen Untereinheit assoziiert ist (Cox, White & Flaks, 1964; Davies, 1964). Das ribosomale Protein S12 bestimmt die Sensitivität dieser 30S Untereinheit gegenüber dem Antibiotikum (Ozaki, Mizushima & Nomura, 1969) und induziert Fehler bei der Translation (Nomura, Mizushima, Traub & Lowry, 1969). Vor kurzem berichteten Biswas und Gorini (1972) über Versuche, aus denen geschlossen wurde, daß Streptomycin an ribosomale RNA bindet.

In einem in vitro System mit natürlichem messenger, z.B. Virus RNA, konnte nachgewiesen werden (Modolell & Davis, 1964b; Modolell & Davis, 1970), daß Streptomycin die Proteinsynthese nahezu vollständig hemmt: die Polypeptidyl-tRNA wird in der p-site blockiert und die Bindung von Aminoacyl-tRNA und Polypeptidyl-tRNA in die a-site verhindert. Darauf erfolgt ein langsamer und stetiger Abbau der Polysomen (Modolell & Davis, 1970). In Bakterienzellen ruft Streptomycin ebenfalls einen Polysomenabbau hervor (Luzzato, Apirion & Schlessinger, 1969; Modolell & Davis, 1969a). Aus dem 30S-Initiationskomplex wird fmet-tRNA durch Streptomycin freigesetzt (Lelong, Gros, Grunberg-Manago & Gros, 1971). Außerdem wird die Bindung von Dihydrostreptomycin an 30S und 70S durch eine Mischung von Initiationsfaktoren verhindert (Lelong, Cousin, Gros, Miskin, Vogel, Groner & Revel, 1972), d.h., daß es in der Nähe der Initiationsfaktoren binden sollte. Alle diese Wirkungen von Streptomycin können durch eine Veränderung der ribosomalen a- und p-site erklärt werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß es zwei unterschiedliche Arten der Streptomycinbindung an das Ribosom gibt: die überwiegende ist an die 30S Proteine gekoppelt und wird durch Bindung von Streptomycin an 30S Untereinheiten getestet, die zweite wird durch 16S und 23S RNA und die 50S Untereinheiten hervorgerufen. Darüber hinaus wurde das proteinabhängige Bindungszentrum auf der 30S Untereinheit durch Zugabe einzelner ribosomaler Proteine zu nicht bindenden LiCl core Partikeln bestimmt.

Material und Methoden

(a) Chemikalien und Puffer

(^3H)-Dihydrostreptomycin (spez. Aktivität 3 Ci/mMol) wurde von Amersham, England und (^{14}C)-l-Phenylalanin (350 mCi/mMol) von New England Nuclear, Boston, bezogen. Polyuridylsäure wurde bei Boehringer, Mannheim, und Desoxyribonuklease (EC 3.1.4.5.) bei Serva, Heidelberg, gekauft. Soluene (Katalog-Nr 60003021), PPO (2,5-Diphenyloxazol, Katalog-Nr. 600205) und POPOP (1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)Benzene, Katalog-Nr. 6002032) stammen von Packard, Frankfurt/Main.

Folgende Puffer wurden verwendet: PO_4 Puffer I (10 mM- K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (pH 7.6), 1 mM- MgCl_2 , 6 mM-Mercaptoäthanol); core-Puffer (20 mM-Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM-MgAc-EDTA (1 M-MgAc-EDTA enthält 1 M-MgAc und 50 mM-EDTA), 200 mM- NH_4Cl , 2 mM-Mercaptoäthanol) und prot-Puffer (das gleiche wie core-Puffer mit 400 mM- NH_4Cl).

(b) Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese

Die Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese wurde nach der durch Nierhaus, Bordasch und Homann (1973) modifizierten Methode von Traub und Nomura (1969) durchgeführt. Das Inkubationsgemisch von 150 μl enthält 12.25 mM-Tris-HCl (pH 7.8), 50 mM- NH_4Cl , 20 mM-KOH (um die Nukleotide und die Salzsäurelösung des (^{14}C)-Phenylalanins zu neutralisieren), 12.25 mM-MgAc, 1.3 mM-ATP, 0.04 mM-GTP, 0.45 mM-Phosphoenolpyruvat, 3 mM-Mercaptoäthanol, 0.001 mM-(^{14}C)-Phenylalanin, 40 μg Polyuridylsäure, 12 μl der S-100 Überstandsenzyme, 3 μg Pyruvatkinase sowie je eine A_{260} Einheit von 30S und 50S. Nach einer Inkubation im Schüttelbad von 45 Minuten bei 30°C wurde ein Tropfen einer 1 % Albuminlösung zugegeben und mit 2 ml 5 % TCA gefällt (10 Min./90°C). Das Präzipitat wurde auf einem Cellulosefilter aufgefangen, mit 0.5 ml Soluene und 5 ml Szintillationsflüssigkeit (7 g PPO + 0.4 g POPOP auf 1 l Toluol) versetzt und in einem Packard Tricarb Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.

(c) Isolierung der 30S und 50S Untereinheiten

Zellen von E.coli K12, Stamm A19 (Gesteland, 1966) wurden mit PO_4 Puffer I, der 5 $\mu\text{g/ml}$ DNase enthielt, gewaschen und mit Alcoa zerrieben. Nach Zugaben von PO_4 Puffer I wurde der Rohextrakt zweimal für 40 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert. Die Ribosomen wurden durch dreistündige Zentrifugation bei 176.000 g sedimentiert, in PO_4 Puffer I resuspendiert (400-700 A_{260} Einheiten pro ml) und ausgiebig gegen denselben Puffer dialysiert. Etwa 7.000 A_{260} Einheiten wurden zur Zonalzentrifugation auf einen BXV Rotor aufgetragen (Nierhaus et al., 1973). Die 30S und 50S Fraktionen wurden jeweils gesammelt, durch Zentrifugation (16 h/176.000 g) sedimentiert und 10 mM-Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM- MgCl_2 , 60 mM- NH_4Cl und 6 mM-Mercaptoäthanol aufgenommen (400-800 A_{260} Einheiten pro ml). Die Reinheit der Untereinheiten wurde im Poly(U) abhängigen in vitro System getestet und (bezüglich der ribosomalen Proteine) in der zweidimensionalen (2D) Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht (Kaltschmidt & Wittmann, 1970). Im Poly(U) System war die Verunreinigung durch die komplementäre Untereinheit geringer als 2 %, während in der 2D Elektrophorese nur Proteine der getesteten Untereinheit zu sehen waren.

(d) Präparation und Analyse der LiCl Split-Proteine

Die Aufarbeitung und Analyse folgte den Angaben von Nierhaus und Montejo (1973). Nach der Hitzeaktivierung (15 Min./37°C) wurden 10.000 A_{260} Einheiten von 30S Untereinheiten in etwa 500 ml TM-Puffer (10 mM-Tris-HCl (pH 8.6) und 10 mM-MgAc-EDTA) mit 1.15 M-LiCl aufgenommen und 5 Stunden bei 0°C inkubiert. Die cores (1.15c) wurden durch fünfstündige Zentrifugation bei 176.000 g sedimentiert und in core-Puffer resuspendiert (etwa 400 A_{260} Einheiten/ml), dialysiert gegen denselben Puffer, und nach einer Klärung durch niedertourige Zentrifugation wurden die A_{260} Einheiten gemessen und die cores bei -80°C gelagert.

Der Überstand mit den Split-Proteinen SP_{1.15} wurde gegen core-Puffer dialysiert und lyophilisiert. Per Definition ist die Menge der Äquivalenzeinheiten (Split -Proteine) gleich der Menge an 1.15c cores, gemessen in A₂₆₀ Einheiten.

Das getrocknete Protein-Salz Gemisch wurde in 5 ml Aquabidest resuspendiert. Die RNA wurde durch Essigsäure-Extraktion entfernt (Zugabe von 2 Vol. Eisessig; 45 Minuten bei 0°C inkubieren und Sedimentierung der RNA durch Zentrifugation von 30 Min./30.000 g). Der Überstand wurde gegen TM-Puffer mit 6 M-Urea dialysiert und auf eine DEAE-Cellulose Säule (1.5 x 20 cm) zur Entfernung der sauren Proteine gegeben. Die Säule war mit demselben Puffer equilibriert und wurde mit 30 ml Puffer nachgewaschen. Das Eluat, welches die basischen Proteine der Split-Proteine SP_{1.15} enthält, wurde gegen prot-Puffer dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die saure Proteinfraction wurde durch eine Stufenelution mit TM-Puffer, der 6 M-Urea und 1 M-NH₄Cl enthält, gewonnen.

Die lyophilisierte basische Fraktion der Split-Proteine SP_{1.15} wurde in 5 ml Aquabidest aufgenommen, gegen core-Puffer mit 6 M-Urea dialysiert und auf eine Sephadex G-100 Säule (2 x 170 cm; core-Puffer mit 6 M-Urea, 2 Tropfen pro Minute, 99 Tropfen je Fraktion) aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden gegen core-Puffer dialysiert, lyophilisiert, in 0.5 ml Aquabidest aufgenommen, gegen prot-Puffer dialysiert, das Volumen gemessen und bei -80°C gelagert.

Ein konstantes Aliquot der einzelnen Fraktionen wurde in einer Acrylamidgelelektrophorese (die erste Dimension der 2D Elektrophorese) analysiert. Die mit Amidoschwarz gefärbten Gele wurden mit einem Joyce-Loebl Densitometer analysiert und die Flächen der verschiedenen Proteine mit einem Planimeter bestimmt. Die Fläche eines Proteingipfels in verschiedenen Fraktionen ist proportional der relativen Konzentration dieses Proteins. Somit kann man den Verlauf der relativen Proteinkonzentrationen auftragen, wie es in Abbildung 4 geschehen ist.

(e) Partielle Rekonstitution der 30S Untereinheit

Die partielle Rekonstitution wurde entsprechend der Methode von Traub und Nomura (1969) durchgeführt. Bei Rekonstitutionen mit kleinen Ansätzen wurden 5 A_{260} Einheiten cores in 75 μ l core-Puffer mit 7 Äquivalenzeinheiten Protein in der gleichen Menge prot-Puffer für 25 Minuten bei 42°C inkubiert. Für Rekonstitutionen größerer Mengen wurde der Ansatz um das Zwanzigfache vermehrt und durch fünfstündige Zentrifugation bei 225.000 g sedimentiert. Die rekonstituierten Partikel wurden in core-Puffer resuspendiert.

Für die Rekonstitution mit den durch Sephadex G-100 fraktionierten Split-Proteinen SP_{1.15} wurde die optimale Proteinkonzentration mit den Proteinen S5 und S9 (Fr. 49 + 53) bestimmt. Da 10 μ l je Fraktion die maximale Bindung ergab, wurde diese Menge für alle weiteren Versuche verwendet.

(f) Gleichgewichtsdialyse

Die Dialysezellen entsprechen denen von Uhlenbeck, Baller und Doty (1970) beschriebenen. Die 50 μ l großen Kammern werden durch eine Dialysemembran (Visking; Serva, Katalog-Nr. 44110) separiert. Die eine Kammer wird mit 1 A_{260} Einheit 30S, cores, rekonstituierten Partikeln oder RNA in 30 μ l Puffer gefüllt und die andere mit 32 pMol Dihydrostreptomycin im gleichen Volumen. Die Endkonzentrationen sind 20 mM-Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM-MgAc, 250 mM-NH₄Cl und 2 mM-mercaptoäthanol. Vor der Gleichgewichtsdialyse wurden die Partikel 15 Minuten bei 37°C hitzeaktiviert. Nach 20 Stunden bei 4°C wurden 2 Proben à 10 μ l aus jeder Kammer entnommen, mit 0.5 ml Soluene und 5 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und gezählt.

(g) Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Poly(U)	Polyuridylsäure
Poly(Phe)	Polyphenylalanin
dHSM	Dihydrostreptomycin
Aquabidest	doppelt destilliertes Wasser
30S	30S Untereinheit
50S	50S Untereinheit
70S	70S Ribosom
16S	die RNA der kleinen Untereinheit
23S	die RNA der großen Untereinheit

Ergebnisse

(a) Bindung von dHSM an Ribosomen und Untereinheiten

Tabelle 1 zeigt die Bindung von dHSM an 70S Ribosomen und an die beiden Untereinheiten. 30S bindet ungefähr 20 mal mehr dHSM als 50S und etwas mehr als 70S, was auch durch die Darstellung nach Scatchard (Abb. 1) gezeigt wird. Beide, sowohl 30S als auch 70S haben weniger als ein Bindungszentrum je Partikel (0.8 bzw. 0.6). Keine Bestätigung wurde für ein zweites Bindungszentrum gefunden, das wiederholt in der Literatur beschrieben wurde (Kaji & Tanaka, 1968; Biswas & Gorini, 1972). Die Bindungskonstanten sind $K_A = 11.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für 70S und $7.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für 30S.

Tabelle 1

<u>Partikel</u>	<u>pM gebundenes dHSM/pM Partikel</u>
70S Ribosomen	0.260
30S Untereinheiten	0.280
50S Untereinheiten	0.014

Bindung von dHSM an 70S Ribosomen, 30S und 50S Untereinheiten, wie man sie bei einer Gleichgewichtsdialyse erhält.

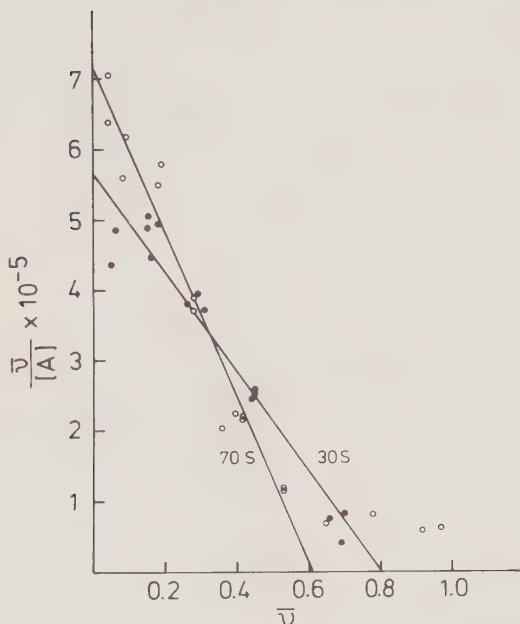


Abb. 1

Auftragung der Daten von der Gleichgewichtsdialyse nach Scatchard. Bindung von dHSM an 30S Untereinheiten und 70S Ribosomen. Die Regressionsgeraden wurden nach Linder (1960) berechnet. Durch Extrapolation auf unendlich große Konzentrationen ungebundenem Antibiotikum (A) ergeben sich 0.8 Bindungszentren pro 30S Untereinheit (●—●) und 0.6 pro 70S Ribosom (○—○). Die Assoziationskonstanten sind $7.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für die 30S Untereinheit und $11.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für das 70S Ribosom.

(b) Charakterisierung des dHSM Bindungszentrums

Es wurde berichtet (Biswas & Gorini, 1972), daß Streptomycin an die ribosomale RNA bindet. Deshalb wurde die Bindung von dHSM an die beiden Untereinheiten (30S und 50S) und 16S und 23S RNA in Abhängigkeit von verschiedenen NH_4Cl Konzentrationen getestet (Abb. 2). Durch diese Experimente wird die Existenz zweier unter-

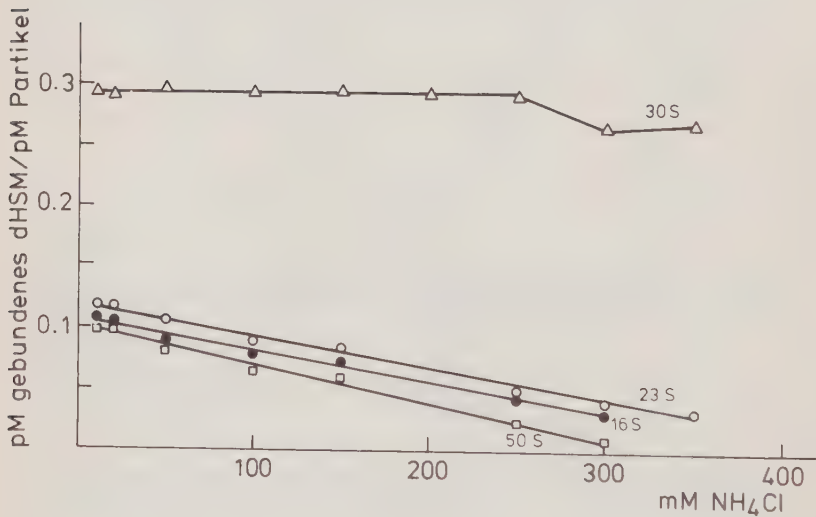


Abb. 2

Bindung von dHSM an 30S (Δ — Δ) und 50S ($\square$ — $\square$) Untereinheiten und 16S ($\bullet$ — $\bullet$) und 23S ($\circ$ — $\circ$) RNA bei unterschiedlichen NH_4Cl Konzentrationen.

Tabelle 2

	30S	0.8c	1.15c	2.0c	3.0c
S1	+	(+)	-	-	-
S2	+	(+)	-	-	-
S3	+	-	-	-	-
S4	+	+	+	+	+
S5	+	(+)	-	-	-
S6	+	+	+	(+)	(+)
S7	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+
S9	+	(+)	(+)	-	-
S10	+	(+)	-	-	-
S11	+	+	-	-	-
S12	+	+	(+)	-	-
S13	+	+	+	+	-
S14	+	-	-	-	-
S15	+	+	+	+	+
S16	+	+	+	+	(+)
S17	+	+	+	+	(+)
S18	+	+	(+)	-	-
S19	+	+	+	+	(+)
S20	+	+	+	-	-
S21	+	(+)	-	-	-

Proteingehalt der von 30S gewonnen LiCl cores. Die Proteine wurden durch 2D Gelelektrophorese identifiziert. Erklärung der verwendeten Symbole:

+ normale Menge; (+) reduzierter Anteil

(+) nur noch Spuren sichtbar; - nicht vorhanden

schiedlicher Bindungstypen offensichtlich. Der erste (Typ A), dargestellt durch die 30S Untereinheit, wird nicht durch steigende NH_4Cl Konzentration (bis 250 mM) beeinflusst. Der zweite (Typ B; 50S Untereinheit, 16S und 23S RNA) ist linear von der Salzkonzentration abhängig: die Bindung nimmt mit steigender NH_4Cl Konzentration ab. Unter allen Bedingungen, die getestet wurden, bindet der erste Typ (30S) wesentlich mehr als der zweite (z.B. 16S RNA).

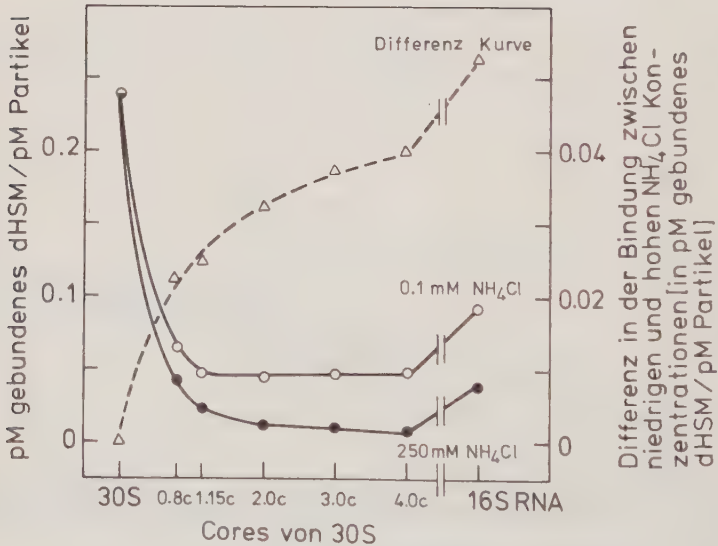


Abb. 3

Bindung von dHSM an 30S, 30S LiCl cores mit abnehmendem Proteingehalt und 16S RNA bei niedriger (0.1 mM) und hoher (250 mM) NH_4Cl Konzentration.

○ — ○ 0.1 mM NH_4Cl
 ● — ● 250 mM NH_4Cl

▲ — ▲ Unterschied in der dHSM-Bindung zwischen 0.1 mM und 250 mM NH_4Cl

Darum scheinen die 30S Proteine direkt an der dHSM-Bindung teilzuhaben. Um diesen Schluß zu untermauern, wurden verschiedene 30S cores präpariert, die nach Behandlung mit steigenden LiCl Konzentrationen eine Abnahme des Proteinbestandes zeigen (Tabelle 2). Diese verschiedenen cores wurden bei niedriger (0.1 mM) und hoher (250 mM) NH_4Cl Konzentration auf dHSM-Bindung getestet (Abb. 3). Die Proteine S2, S3, S5, S10, S14 und S21 sind nicht im 0.8c core vorhanden. Es hat etwa 85 % der Bindungskapazität von 30S verloren. Außerdem zeigt es unterschiedliche Bindung bei den beiden Salzkonzentrationen. Dieser Unterschied in der Bindung steigt, wenn sich der Proteingehalt des cores verringert.

Das 1.15c core enthält noch die Proteine S4, S6, S7, S8, S13, S15, S16, S17, S18, S19 und S20 und zeigt eine dHSM-Bindung, die in der Nähe der Auflösungsgrenze der Methode liegt.

Das 3.0c core hat alle "bindenden Proteine" (d.h. Proteine, die direkt an die 16S RNA binden können (Mizushima & Nomura, 1970; Schaup, Green & Kurland, 1970; Schaup, Green & Kurland, 1971; Garrett, Rak, Daya & Stöffler, 1971; Zimmermann, Garvin & Gorini, 1971)). Die einzige Ausnahme ist das Protein S19, das anstelle von S20 in diesem core enthalten ist.

Die Ergebnisse mit den unterschiedlichen cores machen deutlich, daß die Proteine eine entscheidende Rolle bei der dHSM-Bindung spielen. Das Protein (oder die Proteine), das die dHSM-Bindung bewirkt, muß in der Proteingruppe sein, die bei dem Schritt $30\text{S} \rightarrow 1.15\text{c core}$ abgeht (S1, S2, S3, S5, S9, S10, S11, S12, S14 und S21).

(c) Identifizierung der an der dHSM-Bindung beteiligten Proteine

Durch Rekonstitution mit der Split-Proteinfraktion $SP_{2.0}$ erhält das 2.0c core seine Bindungsaktivität gegenüber dHSM wieder zurück; die Split-Proteine $SP_{1.15}$ führen zu ähnlichen Ergebnissen (50 % Bindung im Vergleich zu 30S, Tab. 3, Exp. 1). Da das Proteinbild des 2.0c cores definierter ist als das des 1.15c cores, wurden die Rekonstitutionen in erster Linie mit den 2.0c cores durchgeführt.

Die von 10.000 A_{260} Einheiten 30S gewonnenen Split-Proteine $SP_{1.15}$ wurden auf eine Sephadex G-100 Säule gegeben. Eine Probe jeder Fraktion wurde durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht und mit einem Joyce-Loebl Densitometer ausgewertet. Aus diesen Kurven konnte die relative Konzentration eines jeden Proteins in jeder Fraktion bestimmt werden; für jedes Protein wurde eine Kurve der relativen Konzentrationen gezeichnet (Abb. 4).

Unter Rekonstitutionsbedingungen wurde eine Probe jeder Fraktion zu 2.0c cores hinzugegeben und die Bindung von dHSM an diese rekonstituierten Partikel bestimmt. Die Bindungskurve wurde den Konzentrationskurven überlagert (Abb. 4). Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, haben die Proteine S9, S12, S14 (S10) und S18 (S21) nur einen geringen Einfluß auf die dHSM-Bindung (0.013 pM/Partikel). S5 (Fr. 49) ist das einzige Protein, das allein nach der Rekonstitution mit dem 2.0c core signifikante Bindung zeigt (0.037 pM/Partikel). Die Schulter in der Bindungskurve zwischen den Proteinen S5 und S9 zeigt eine Stimulierung der S5 abhängigen Bindung durch S9 an. Die maximale Bindung erhalten wir zwischen den Gipfeln von S3 und S5; S3 allein zeigt aber keinerlei Bindung nach der Rekonstitution mit dem 2.0c core. Das ist aber auch nicht zu erwarten, denn nach der Assoziations-Karte (assembly map; Mizushima & Nomura, 1970) ist die Bindung von S3 an das core von den Proteinen S5, S9, S10 und S14 abhängig. Diese vier Proteine

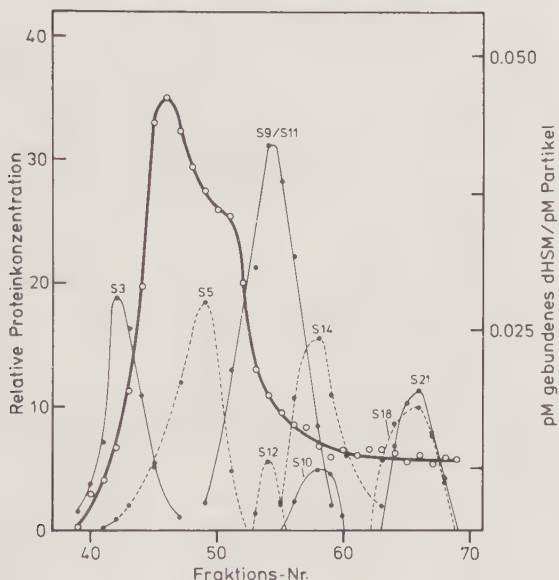


Abb. 4

Sephadex G-100 Gelfiltration der Split-Proteine SP_{1.15}

Bevor die Split-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, wurde die RNA durch Essigsäure und die sauren Proteine durch DEAE-Cellulose Chromatographie entfernt. Eine Probe jeder Fraktion wurde im Joyce-Loebl Densitometer analysiert und die relative Konzentration der Proteine berechnet (●—● oder ●---●). Ein weiteres Aliquot jeder Fraktion wurde unter Rekonstitutionsbedingungen mit dem 2.0c inkubiert und die dHSM-Bindung jedes rekonstituierten Partikels durch die Gleichgewichtsdialyse bestimmt (○—○). Für weitere Einzelheiten siehe Material und Methoden.

Tabelle 3

Experiment	Partikel	pM gebundenes dHSM/pM Partikel
1	30S	0.278
	2.0c	0.009
	SP _{2.0}	0.005
	SP _{1.15}	0.005
	2.0c + SP _{2.0}	0.120
	2.0c + SP _{1.15}	0.125
2	2.0c	0.008
	+S5	0.031
	+S5+S3	0.055
	+S5+S9	0.050
	+S5+S14(S10)	0.050
	+S5+S18(S21)	0.036
	+S5+S9+S14(S10)	0.090
	+S5+S3+S9+S14(S10)	0.124
	+S9+S14(S10)	0.018
	+S3+S9+S14(S10)	0.050
3	2.0c+S3+S5+S9+S14(S10) (Inkubation 0°C/25 Min.)	0.110
	2.0c+S3+S5+S9+S14(S10) (Inkubation 42°C/25 Min.)	0.140
4	2.0c	0.008
	+S5	0.024
	+S9	0.012
	+S11	0.012
	+S5+S9	0.040
	+S5+S9+S11	0.042
5	3.0c	0.009
	+S3+S5+S14(S10)	0.032
	+S3+S5+S9+S14(S10)	0.046
	+S3+S5+S9+S14(S10)+S12	0.036

Bindung von dHSM an rekonstituierte Partikel

Die Rekonstitutionen wurden mit 2.0c cores und den einzelnen Split-Protein Fraktionen der Sephadex G-100 Säule durchgeführt (Exp.1-3, 5). Falls nicht näher gekennzeichnet, entsprechen die Proteine den folgenden Fraktionen (s. Abb. 4): S3, Fr.42; S5, Fr.49; S9, Fr.56; S14(S10), Fr.66. In Experiment 5 wurde für S9 Fraktion 57 verwendet, und in Experiment 4 wurden Proteine gebraucht, die nach der durch Hindennach et al. (1971) beschriebenen Methode isoliert wurden.

sind aber nicht mehr auf dem 2.0c core vorhanden. Deshalb können mit diesem Experiment nicht die folgenden Alternativen unterschieden werden: (a) S3 stimuliert die S5 abhängige Bindung; (b) S3 ist zusammen mit S5 ein Bestandteil des dHSM Bindungszentrums.

Aus diesem Grund wurden die Partikel (2.0c + S9 + S14 (S10)) (daran sollte S3 auch ohne S5 in einem gewissen Maß binden) und (2.0c + S9 + S14 (S10) + S3) konstruiert. Das Partikel (2.0c + S9 + S14 (S10)) zeigt die gleiche niedrige Bindungsaktivität (Tab. 3, Exp. 2) wie die Partikel (2.0c + S9) und (2.0c + S14 (S10)) (Abb. 4, Fr. 55 bzw. 59). Andererseits stimuliert S3 deutlich die dHSM-Bindung (siehe Partikel (2.0c + S3 + S9 + S14 (S10)), Tab. 3, Exp. 2). Das läßt den Schluß zu, daß sowohl S3 als auch S5 einen Teil des dHSM Bindungszentrums darstellen.

Um festzustellen, ob außer S9 auch noch andere Proteine die S5 abhängige Bindung stimulieren, wurden alle anderen Split-Proteine zusammen mit S5 getestet (Tab. 3, Exp. 2). S14 (S10) steigert die S5 abhängige dHSM-Bindung in demselben Maße wie S9 (0.050 pM/pM Partikel), während S18 (S21) keine Stimulierung zeigt. Das Partikel (2.0c + S5 + S9 (S12) + S14 (S10)) ergibt eine zusätzliche Steigerung (0.090 pM/pM Partikel), während diese Kombination durch Zugabe von S3 gleich viel dHSM bindet wie das Partikel (2.0c + SP_{1.15}), nämlich 0.124 pM/pM Partikel. Auch in der Kälte stimuliert das 2.0c core zusammen mit den fünf Proteinen S3, S5, S9 und S14 (S10) die dHSM-Bindung (Tab. 3, Exp. 3).

Ein Punkt muß noch etwas ausführlicher untersucht werden: Der größte Teil des Proteins S11 wandert bei der 2D Elektrophorese wie S9 und auch bei der Gelfiltration können diese beiden Proteine nicht getrennt werden. Da das Proteinbild des 1.15c core nur Spuren von S9 und kein S11 zeigt (Tab. 2), ist es wahrscheinlich, daß der große S9 Gipfel (Abb. 4) zusätzlich noch S11 enthält. Daher muß geklärt werden, ob die oben beschriebenen Ergebnisse mit S9 und/oder S11 hervorgerufen werden. Deshalb wurden Rekonstitutionen mit S9 und S11 durchgeführt, die nach der Standardmethode isoliert wurden

(Hindennach et al., 1971; siehe Tab. 3, Exp. 4). Sowohl S9 als auch S11 haben keinen signifikanten Einfluß auf die dHSM-Bindung. Aber S9 stimuliert die S5 abhängige Bindung im gleichen Maß (≈ 1.6) wie das durch Gelfiltration isolierte (S9 + S11) (Tab. 3, Exp. 2), während S11 keinen Einfluß auf die durch S5 induzierte Bindung hat (Tab. 3, Exp. 4). Deshalb sollte S9 und nicht S11 der Teil des "S9" Gipfels sein, der die S5 abhängige dHSM-Bindung stimuliert.

(d) Der Einfluß von S12 auf die dHSM-Bindung

Verschiedene Autoren haben beschrieben, daß str^R Ribosomen kein dHSM binden können (Kaji & Tanaka, 1968; Ozaki et al., 1969). Tabelle 4 zeigt die Bindung verschiedener str^R Ribosomen, die ein unterschiedliches Fehllesen in einem Poly(U) abhängigen in vitro System zeigen (Funatsu, Nierhaus & Wittmann, 1972).

Tabelle 4

<u>Partikel</u>	<u>pM gebundenes dHSM/pM Partikel</u>
70S A19	0.250
70S SM1	0.076
70S SM10	0.021

Bindung von dHSM an Wildtyp 70S (A19) und unterschiedlich streptomycinresistente 70S (SM1 und SM10).

Die Reihenfolge der ansteigenden Restriktion (A19, SM1, SM10) ist umgekehrt proportional zur dHSM-Bindung, d.h. Ribosomen mit geringer REstriktion binden relativ viel dHSM und vice versa. Bei diesen str^R Mutanten handelt es sich um Punktmutationen und sie haben nur einen Aminosäureaustausch im Protein S12 (Funatsu et al., 1972). Bei der 2D Elektrophorese war bei drei Aufarbeitungen kein S12 auf dem 2.0c core zu erkennen, während bei einer Spuren von S12 zu sehen waren. Mit der Annahme, daß im allgemeinen immer Spuren von

S12 auf dem core sind, lassen sich die in Tabelle 3 beschriebenen Ergebnisse auch folgendermaßen erklären: S12 könnte das dHSM bindende Protein sein, aber seine aktive Konformation wäre ausschließlich von S3 und S5 abhängig. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Rekonstitutionen mit dem 3.0c core durchgeführt, bei dem selbst bei überladenen 2D Elektrophoreseplatten kein S12 zu entdecken ist. Tabelle 3, Experiment 5 zeigt, daß die Proteine S3, S5 und S14 (S10) mit und ohne S9 (Fr. 57 enthält kein S12) signifikante Bindung induzieren, während die Zugabe von isoliertem S12 keinen Einfluß auf die Bindung hat. Darum ist S12 nicht das bindende Protein.

Das Partikel (2.0c + S3 + S5 + S9 + S14(S10)) zeigt eine um das 2.5fache höhere Bindung als das entsprechende Partikel mit dem 3.0c core (Tab. 3, Exp. 3 bzw. Exp. 5). Die Ursache könnte darin liegen, daß das 3.0c core die Proteine S16, S17 und S19 nur noch vermindert (und S13 gar nicht mehr) enthält, denn diese Proteine sind entsprechend der Assoziations-Karte für die optimale Bindung von S3 und S5 notwendig.

Diskussion

Biswas und Gorini kamen auf Grund ihrer Bindungsversuche mit Streptomycin zu dem Ergebnis, daß die 16S RNA den Bindungsort von Streptomycin auf der 30S Untereinheit darstellt. Da sie eine sehr hohe Bindung von 0.7 Molekülen Streptomycin pro 50S Untereinheit finden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kaji und Tanaka (1968) und den hier demonstrierten Untersuchungen steht (Tab. 1), liegt der Schluß nahe, daß Streptomycin unspezifisch unter ihren Bedingungen gebunden wird (geringe Konzentration an monovalenten Ionen (0.3 mM-KCl) während der Bindung und hohe monovalente Ionenkonzentration (300 mM-KCl) während der anschließenden Dialyse).

Aus diesem Grund wurde die NH_4Cl Abhängigkeit der dHSM-Bindung an die 30S und 50S Untereinheiten sowie 16S und 23S RNA untersucht (Abb. 2). Bei niedrigen NH_4Cl Konzentrationen liegt ein Bindungsverhältnis von 1:2.6 (50S:30S) vor, welches dem von Biswas und Gorini (1:2.9) entspricht, während das Verhältnis bei hohen Konzentrationen auf etwa 1:15 steigt. Das auffallende Ergebnis, das in Abb. 2 deutlich wird, ist das unterschiedliche Verhalten von 30S im Vergleich zu 50S, 16S und 23S RNA. Die dHSM-Bindung an 30S ist bis 250 mM unabhängig von der NH_4Cl Konzentration, wohingegen die Bindung an 50S, 16S und 23S RNA von der NH_4Cl Konzentration abhängt: die Bindung nimmt mit steigender NH_4Cl Konzentration ab (10 - 300 mM). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß es zwei Bindungstypen für dHSM gibt: den Typ A für 30S Bindung und den Typ B für die Bindung an 50S Untereinheiten, 16S und 23S RNA.

Um den Bindungstyp A (30S Untereinheiten) näher zu charakterisieren, wurden verschiedene 30S cores bei niedrigen und hohen NH_4Cl Konzentrationen auf dHSM-Bindung getestet (Abb. 3). Wie auf Grund von Abb. 2 zu erwarten war, bindet 30S unter beiden Bedingungen gleich viel dHSM. Während der Umwandlung von 30S zum 1.15c core wird der Typ B (50S, 16S und 23S RNA) bezüglich der dHSM-Bindung vorherrschend, wie man aus der erhöhten Abhängigkeit von der NH_4Cl

Konzentration erkennen kann. Der Verlust der 10 Proteine (S1, S2, S3, S5, (S9), S10, (S12), S14, (S18) und S21) bei dieser Umwandlung, scheint Teile der RNA für die Wechselwirkung mit dHSM zugänglich zu machen, was zu einer steigenden Differenz der Bindungswerte zwischen niedriger und hoher Kationenkonzentration führt. Keine größeren Veränderungen der dHSM-Bindung sind bei dem Schritt 1.15c core nach 3.0c core zu beobachten, d.h. bei Verlust von S6, (S12), S18 und S21. Gehen jedoch die Proteine S4, S7, S8, S15, S16, S17 und S19 ab (3.0c→16S), steigt die Bindung bei niedriger NH_4Cl Konzentration auf etwa 30 % im Vergleich zur 30S Bindung, während bei hoher NH_4Cl Konzentration nur ein geringer Anstieg zu verzeichnen ist. Wegen der starken Abnahme der Bindung, die durch der Verlust von Proteinen bei dem Schritt 30S→1.15c hervorgerufen wird, ist es naheliegend, daß der Typ A bei der dHSM-Bindung proteinabhängig ist und daß die Proteinfraction, die für die dHSM-Bindung verantwortlich ist, während der Umwandlung von 30S zum 1.15c core abgeht.

Die Anzahl der Bindungszentren des proteinabhängigen Bindungstypes A (30S) wurde mittels einer Scatchard-Auftragung bestimmt (Abb. 1). Die Linearität der erhaltenen Kurve zeigt, daß es nur einen Bindungstyp für die 30S Untereinheit gibt. Würde es mehr als eine Klasse von Bindungstypen geben, wäre die Kurve nicht linear (Edsall & Wyman, 1958). Außerdem kann man aus der Kurve ersehen, daß es weniger als ein Bindungszentrum gibt, und zwar 0.8 für 30S und 0.6 für 70S. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denen von Kaji und Tanaka (1968) überein, die ein Bindungszentrum bei niedrigen und zwei bei hohen dHSM Konzentrationen finden, sowie mit denen von Biswas und Gorini (1972), die zwei Bindungszentren pro 30S Untereinheit beschreiben.

Die Bindungsaktivität, die das 2.0c core verloren hat, kann es zu 50 - 60 % (verglichen mit 30S) durch Rekonstitution mit den Split-Proteinen $\text{SP}_{1.15}$ wiedererlangen (Tab. 3, Exp. 1). Die Analyse der Proteinfraction $\text{SP}_{1.15}$ zeigte, daß jedes der beiden Proteine

S3 und S5 für sich signifikante Bindung auf dem 2.0c core wiederherstellen können. Während S9 und S14 (S10) keinerlei Aktivität hervorrufen, stimulieren sie die S5 abhängige Bindung (Abb. 4 und Tab. 3, Exp. 2). Da die Darstellung nach Scatchard nur einen Bindungstyp bei 30S erkennen läßt, ist es wahrscheinlich, daß S3 und S5 ein Teil eines Bindungszentrums sind. Deshalb sollten S3 und S5 benachbart sein. In zwei Experimenten (eins davon ist in Abb. 1 zu sehen) binden die 70S Ribosomen weniger als die 30S Untereinheiten (0.6 bzw. 0.8). Deshalb kann vermutet werden, daß die Assoziation der 30S und 50S Untereinheiten den Zugang zum Bindungszentrum oder dessen Konformation verändert. Aus diesem Grund scheint das Bindungszentrum in oder nahe der Berührungsfläche der beiden Untereinheiten zu liegen.

Wenn S3 und S5 die für die dHSM-Bindung hauptsächlichen Proteine sind, dann zeigt das Partikel (2.0c + S3 + S5) eine erstaunlich geringe Bindung (0.055 pM/pM Partikel). Dafür scheinen zwei Gründe verantwortlich zu sein: (a) S9 und S14 (S10), die nicht auf diesem Partikel sind, scheinen die für die dHSM-Bindung notwendige Konformation von S5 zu optimieren; (b) S5 ist ebenso wie S9 und S14 (S10) entsprechend der Assoziations-Karte (Mizushima & Nomura, 1970) für die optimale Bindung von S3 an das 2.0c core notwendig. Daher stimulieren S9 und S14 (S10) sehr kräftig die dHSM-Bindung an (S3 + S5) (vergleiche die Kombination (2.0c + S3 + S5) und (2.0c + S3 + S5 + S9 + S14 (S10)) in Tab. 3, Exp. 2). Die Tatsache, daß S14 und S10 (und vielleicht auch S3) nicht in jeder 30S Untereinheit vorhanden sind (Voynow & Kurland, 1971; Weber, 1972), mag dafür verantwortlich sein, das bei 30S und 70S weniger als ein Bindungszentrum gefunden wird (0.8 bzw. 0.6, siehe Abb. 1).

Die Proteine (S3 + S5 + S9 + S14 (S10)) können sowohl bei niedriger Temperatur (0°C) als auch bei höherer Temperatur (42°C) die dHSM-Bindungsfähigkeit auf dem 2.0c core wiederherstellen. Daher ist für die Bildung und Zusammenlagerung des dHSM Bindungszentrums auf dem 2.0c core keine thermische Energie notwendig.

Ozaki et al. (1969) haben durch Rekonstitutionen mit str^{r} und str^{s} Ribosomen gezeigt, daß das Protein S12 an der dHSM-Bindung beteiligt ist. Dies wird durch Bindungsversuche mit verschiedenen str^{r} Ribosomen, die einen Aminosäureaustausch im Protein S12 haben, unterstützt (Tab. 4). Je größer die Restriktion der Ribosomen, desto geringer ist die dHSM-Bindung. Aus den Bindungsversuchen mit den fraktionierten Split-Proteinen $\text{SP}_{1.15}$ geht klar hervor, daß das dHSM Bindungszentrum auch ohne S12 auf dem 2.0c core konstruiert werden kann, denn das Partikel (2.0c + S3 + S5 + S9 + S14(S10)) bindet ebenso gut dHSM wie das Partikel (2.0c+ $\text{SP}_{1.15}$) (0.124 bzw. 0.125 pM/pM Partikel; Tab. 3, Exp. 1 und 2).

Es bleiben schließlich zwei Möglichkeiten, um die Rolle von S12 bei der dHSM-Bindung zu erklären: (a) S12 unterstützt die (S3 + S5) abhängige Bindung ähnlich wie S9 und S14 (S10) und eine Veränderung in S12 Konformation (str^{r} Ribosomen) würde das dHSM Bindungszentrum beeinflussen. (b) S12 kontrolliert sterisch den Zugang zum Bindungszentrum. Das "normale" Wildtyp S12 würde die Bindung von S12 ermöglichen, während ein verändertes (str^{r}) S12 oder fehlendes S12 den Zugang zum Bindungszentrum blockiert. Obwohl die Ergebnisse in Tabelle 3, Exp. 5 nicht für die Alternative (a) sprechen, kann diese nicht völlig ausgeschlossen werden. Dieses Experiment wurde mit einem nach der Standardmethode (Hindennach et al., 1971) isolierten S12 durchgeführt. Einige dieser Proteine haben während der Isolierung ihre biologische Aktivität verloren (z.B. S3), während andere (z.B. S5 und S9) noch aktiv sind. Daher kann das hier verwendete isolierte S12 inaktiv und somit nicht in der Lage sein, die S3 abhängige Bindung zu stimulieren. Weitere Experimente sind notwendig, um zwischen den Alternativen (a) und (b) zu unterscheiden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß S3 und S5 gemeinsam das dHSM Bindungszentrum bilden und daß die Proteine S9 und S14 (S10) die Konformation von S3 und S5 beeinflussen. S12 scheint nicht direkt am Bindungszentrum beteiligt zu sein, obwohl die dHSM-Bindung auf noch nicht geklärte Weise kontrolliert.

Genetische und biochemische Untersuchungen sind in Einklang mit den hier vorgelegten Ergebnissen. Die Fähigkeit von S12, bei der Translation Fehler zu induzieren, wird durch eine mutative Veränderung von S12 eingeschränkt, wie man es auch in streptomycinresistenten Mutanten gefunden hat (Gorini, 1971). Andererseits werden Translationsfehler durch eine Mutation in einem anderen ribosomalen Gen verstärkt (ram; Rosset & Gorini, 1969). Das Protein S12 einerseits und die Proteine S4, S5 und S11 andererseits sind Antagonisten, welche die Ablesegenauigkeit bei der Translation kontrollieren (Birge & Kurland, 1970; Deusser, Stöffler, Wittmann & Apirion, 1970; Zimmermann, Garvin & Gorini, 1971; Kreider & Brownstein, 1971; Stöffler, Deusser, Wittmann & Apirion, 1971; Kreider & Brownstein, 1972; Nomura et al., 1969). Falls eine Seite verändert wird, wird die andere dominieren. Das Fehllesen, das Streptomycin hervorruft, kann man dadurch erklären, daß dieses Antibiotikum an eines oder mehrere Proteine bindet, die bedeutsam für die Ablesegenauigkeit sind, womit das durch das Protein S12 induzierte Fehllesen dominant wird.

Streptomycin interferiert offensichtlich mit der tRNA Bindung an das Ribosom. Nach den Arbeiten von Modolell und Davis (1969b, 1970) blockt Streptomycin die Polypeptidyl-tRNA in der p-site, schwächt die Bindung von Aminoacyl-tRNA und Polypeptidyl-tRNA in die a-site, stimuliert das Fehllesen und führt zum Abbau der Polysomen. Diese Effekte lassen sich durch eine Veränderung der a-site erklären.

Die Bindung von fmet-tRNA an den 70S-Initiationskomplex wird durch Streptomycin gehemmt, während die Bindung von fmet-tRNA an den mRNA-30S-Initiationskomplex in An- und Abwesenheit von Streptomycin nicht verhindert wird (Modolell & Davis, 1970). Jedoch verliert der 30S-Initiationskomplex nach Zugabe von 50S und in Anwesenheit von Streptomycin die gebundene fmet-tRNA. Fmet-tRNA bindet nicht in die a-site (Kuechler, 1971; Thach & Thach, 1971). In Abwesenheit von GTP wird fmet-tRNA aber nicht in eine für die Puromycin Reaktion notwendige Lage gebracht, d.h. es handelt sich hier um eine Art "prä-p-site", denn eine Translokation der fmet-tRNA erfolgt auch

nicht mehr (Kuechler, 1971; Thach & Thach, 1971). GTP-Hydrolyse ist für die "Accommodation" (Thach & Thach, 1971) der fmet-tRNA notwendig. Die optimale Ausrichtung der fmet-tRNA für die Peptidsynthese und nicht deren Bindung verbraucht Energie. Verwendet man bei der Bildung des Initiationskomplexes das GTP Analog GMPPCP, welches die sterischen Eigenschaften des GTP hat, aber nicht hydrolysiert werden kann, hat Streptomycin keinen Einfluß auf die fmet-tRNA Bindung, d.h. die Initiations-tRNA muß sich an einer Stelle befinden, in der sie mit Puromycin reagieren kann (p-site), bevor Streptomycin wirkt. Das bedeutet, daß Streptomycin nicht nur die a-site verändert (Modolell & Davis, 1969), sondern auch die p-site beeinflußt und in seiner Konformation verändert.

Die mRNA abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an das Ribosom ist vollständig abhängig von den Proteinen S3, S10 und S14 (Traub, Hosokawa, Craven & Nomura, 1967). Außerdem berichten Randall-Hazebauer und Kurland (1972) von einer Stimulierung der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese sowie der EF-T_u abhängigen Aminoacyl-tRNA Bindung durch S2, S3 und S14. Damit sind schon zwei Hinweise vorhanden, welche Proteine an der Bildung der a-site auf der 30S Untereinheit beteiligt sind. Auf Grund der hier vorgelegten Untersuchungen ist klar, das die Proteine S3 und S5 als primäre Bindungsproteine und S9 und S14 (S10) als stimulierende Proteine für die dHSM-Bindung anzusehen sind. Mit diesem Ergebnis lassen sich ohne Schwierigkeiten die bisher bekannten Auswirkungen von Streptomycin erklären: S3, S10 und S14 sind als a-site Proteine bekannt, aber auch S5 und S9 sind in oder dicht bei der a-site lokalisiert, denn diese beiden Proteine sind für die EF-G abhängige GTPase Aktivität notwendig (Marsh & Parmeggiani, 1973) und sind in der 30S Untereinheit benachbart (Bickle, Hershey & Traut, 1972). Das GTPase-Zentrum soll aber nach neueren Ergebnissen in der ribosomalen a-site lokalisiert sein (Yokosawa, Inoue-Yokosawa, Arai, Kawakita & Kaziro, 1973; Modolell & Vazquez, 1973; Werner, Bordsasch & Mierhaus, 1973). Damit wären alle an der dHSM-Bindung beteiligten Proteine in oder nahe

der a-site lokalisiert, und es ist daher nicht verwunderlich, daß durch die Bindung von Streptomycin falsche Aminoacyl-tRNAs angelagert werden (Fehllesen bei Homopolynukleotiden) oder die Bindung von Aminoacyl-tRNAs oder Polypeptidyl-tRNAs an die a-site geschwächt oder völlig verhindert wird (natürlicher messenger und in vivo). Das Freisetzen der fmet-tRNA (Modolell & Davis, 1970) wäre vielleicht dadurch zu erklären, daß S12, das für die fmet-tRNA Bindung notwendig ist (Ozaki et al., 1969), durch die Bindung von dHSM an S3 und S5 derart in seiner Konformation verändert wird, daß es die Initiations-tRNA nicht länger an das Ribosom binden kann. Aber auch das Freisetzen der in der p-site blockierten Polypeptidyl-tRNA läßt sich so erklären, da möglicherweise nach der Initiation S12 durch S21 beeinflusst wird, denn S21 hemmt die fmet-tRNA Bindung (van Duin, van Knippenberg, Dieben & Kurland, 1972). Genaueres über Wechselwirkungen zwischen S12 und S21 ist aber nicht bekannt. Eine Kombination der drei Initiationsfaktoren kann die Freisetzung der fmet-tRNA durch dHSM verhindern (Lelong et al., 1972), d.h., daß die Initiationsfaktoren die Bindung von dHSM an das Ribosom hemmen und damit zumindest in der Nähe von dHSM an das Ribosom binden.

Zusammenfassung

Biswas und Gorini postulierten 1972 für die Streptomycin-Bindung an Ribosomen eine Bindung an ribosomale RNA, die durch die ribosomalen Proteine kontrolliert wird. Die in der Arbeit vorgestellten Experimente konnten zunächst zwei Bindungstypen aufzeigen. Bei steigenden NH_4Cl Konzentrationen zeigen die 30S Untereinheiten im Gegensatz zu den 50S Untereinheiten und 16S und 23S RNA bezüglich der dHSM-Bindung ein unterschiedliches Verhalten: in dem weiten Bereich von 10 bis 250 mM wird die 30S Bindung nicht durch NH_4Cl beeinflusst, während die Bindung an 50S und die beiden RNAs bei steigenden NH_4Cl Konzentrationen abnimmt. Die Bindung an 30S war je nach Bedingung 3 bis 15 mal größer als an die RNA oder 50S Untereinheit, d.h., eine Beteiligung der 30S Proteine liegt nahe. Diese Annahme wurde dadurch bewiesen, daß die Bindungsfähigkeit von dHSM an 30S mit abnehmenden Proteingehalt abnimmt. Mit Hilfe von LiCl wurden die Proteine von der 30S Untereinheit abgewaschen (Split-Proteine und cores).

Die Split-Proteine $\text{SP}_{1.15}$ wurden durch DEAE-Cellulose Chromatographie und Sephadex G-100 Gelfiltration analysiert. Nach einer Rekongstitution mit den nicht bindenden 2.0 M-LiCl cores zeigte es sich, daß sowohl S3 als auch S5 unabhängig voneinander dHSM binden können. Die S5 abhängige Bindung wird durch die Proteine S9 und S14 (S10) stimuliert. Die Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard ergibt 0.8 Bindungsstellen pro 30S Untereinheit. Auf Grund der hier gezeigten Ergebnisse kann gefolgert werden, daß S3 und S5 Teil eines dHSM Bindungszentrums auf der 30S Untereinheit sind.

Literatur

- Bickle, T. A., Hershey, J. B. W. & Traut, R. R. (1972),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 1327-1331
- Birge, E. A. & Kurland, C. G. (1970),
Molec. Gen. Genet. 109, 356-369
- Biswas, D. K. & Gorini, L. (1972),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 2141-2144
- Cox, E. C., White, J. R. & Flaks, J. G. (1964),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 703-709
- Davies, J. E. (1964),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 659-664
- Davies, J. E. Gilbert, W. & Gorini, L. (1964),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 883-890
- Davies, J. E., Gorini, L. & Davis, B. D. (1965),
J. Mol. Pharmacol. 1, 93-106
- Deusser, E., Stöffler, G., Wittmann, H. G. & Apirion, D. (1970),
Molec. Gen. Genet. 109, 298-302
- Duin, J. van, Knippenberg, P. H. van, Dieben, M. & Kurland, C. G.
(1972), Molec. Gen. Genet. 116, 181-191
- Edsall, J. T. & Wyman, J. (1958),
Biophysical chemistry, chapter 11, Academic Press, New York
- Flaks, J. G., Cox, E. C., Witting, M. L. & White, J. R. (1962),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 390-393
- Funatsu, G., Nierhaus, K. H. & Wittmann, H. G. (1972),
Biochem. Biophys. Acta. 287, 282-291
- Garrett, R. A., Rak, K. H., Daya, L. & Stöffler, G. (1971),
Molec. Gen. Genet. 114, 112-124
- Gesteland, R. F. (1966),
J. Mol. Biol. 16, 67-84
- Gorini, L., Gundersen, W. & Burger, M. (1961),
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 173-187
- Gorini, L. (1971),
Nature New Biology 234, 261-264

- Hindennach, I., Stöffler, G. & Wittmann, H. G. (1971),
Eur. J. Biochem. 23, 7-11
- Kaji, H. & Tanaka, Y. (1968),
J. Mol. Biol. 32, 221-230
- Kaltschmidt, E. & Wittmann, H. G. (1970),
Anal. Biochem. 36, 401-412
- Kreider, G. & Brownstein, B. L. (1971),
J. Mol. Biol. 61, 135-142
- Kreider, G. & Brownstein, B. L. (1972),
J. Bact. 109, 780-783
- Kuechler, E. (1971),
Nature New Biology 234, 216-218
- Luzzato, C. Apirion, D. & Schlessinger, D. (1969),
J. Mol. Biol. 42, 315-335
- Lelong, J. C., Cousin, H. A., Gros, D. Grunberg-Manago, H. & Gros, F.
(1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 530-537
- Lelong, J. C., Cousin, H. A., Gros, F., Misking, R., Vogel, Z.,
Groner, Y. & Revel, M. (1972), Eur. J. Biochem. 27, 174-180
- Linder, A. (1960), Statistische Methoden,
Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, S. 147-160
- Marsh, R. C. & Parmeggiani, A. (1973),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 151-155
- Mizushima, S. & Nomura, M. (1970),
Nature 226, 1214-1218
- Modolell, J. & Davis, B. D. (1969a),
Nature 224, 345-348
- Modolell, J. & Davis, B. D. (1969b),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61, 1279-1286
- Modolell, J. & Davis, B. D. (1970),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 67, 1148-1155
- Modolell, J. & Vazquez, D. (1973),
J. Biol. Chem. 248, 488-493
- Nierhaus, K. H., Bordasch, K. & Homann, H. E. (1973),
J. Mol. Biol. 74, 587-597
- Nierhaus, K. H. & Montejo, V. (1973),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 1931-1935

- Nomura, M., Mizushima, S., Ozaki, M., Traub, P. & Lowry, C. V.
(1969), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 49-61
- Ozaki, M., Mizushima, S. & Nomura, M. (1969),
Nature 222, 333-339
- Randall-Hazelbauer, L. L. & Kurland, C. G. (1972),
Molec. Gen. Genet. 115, 234-242
- Rosset, R. & Gorini, L. (1969),
J. Mol. Biol. 39, 95-112
- Scatchard, G. (1949),
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672
- Schaup, H. W., Green, M. & Kurland, C. G. (1970),
Molec. Gen. Genet. 109, 193-205
- Schaup, H. W., Green, M. & Kurland, C. G. (1971),
Molec. Gen. Genet. 112, 1-8
- Speyer, J. F., Lengyel, P. & Basilio, C. (1962),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48, 684-686
- Spotts, C. R. & Stanier, R. Y. (1961),
Nature 192, 633-637
- Stöffler, G., Deusser, E., Wittmann, H. G. & Apirion, D. (1971),
Molec. Gen. Genet. 111, 334-341
- Thach, S. S. & Thach, R. E. (1971),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1791-1795
- Traub, P., Hosokawa, K., Craven, G. R. & Nomura, M. (1967),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58, 2430-2436
- Traub, P. & Nomura, M. (1969),
J. Mol. Biol. 40, 391-413
- Uhlenbeck, O. C., Baller, J. & Doty, P. (1970),
Nature 225, 508-512
- Weber, H. J. (1972), Molec. Gen. Genet. 119, 233-248
- Werner, R., Bordasch, K. & Nierhaus, K. H. (1973),
Manuskript in Vorbereitung
- Yokosawa, H., Inoue-Yokosawa, N., Arai, K.-I., Kawakita, M. &
Kaziro, Y. (1973), J. Mol. Chem. 248, 375-377
- Voynow, P. & Kurland, C. G. (1971), Biochemistry 10, 517-524
- Zimmermann, R. A., Garvin, R. T. & Gorini, L. (1971),
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2263-2267

Lebenslauf

Als erstes Kind des technischen Angestellten Werner Schreiner und seiner Ehefrau Erika, geb. Handke, wurde ich am 15. August 1947 in Hamburg geboren. Bis zu unserem Umzug nach Berlin im Frühjahr 1957 besuchte in Hamburg die Volksschule. Nach Beendigung der Grundschulzeit ging ich auf das Friedrich-Ebert-Gymnasium, wo ich im Februar 1968 mein Abitur machte. Seit dem Wintersemester 1968/69 studiere ich Biologie an der Freien Universität Berlin. Meine Doktorarbeit habe ich im November 1971 am Max Planck Institut für Molekulare Genetik begonnen.

